

**Biologische Halbwertszeit
und Umsatz von Immunglobulin-G
normaler und dysgammaglobulinämischer Haushühner**

Hans-Jürgen Bohner

1977

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin
der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker
Angefertigt unter Leitung von PD. Dr. U. Lösch

Biologische Halbwertszeit und Umsatz von Immunglobulin-G
normaler und dysgammaglobulinämischer Haushühner

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Hans-Jürgen Bohner
aus
Nersingen

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Tiermedizin der Universität

München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Priv.-Doz. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 29. Juli 1977



1.	Einleitung und Literatur	1
2.	Material und Methoden	4
2.1.	IgG-Präparation	4
2.1.1.	Normalserum	4
2.1.2.	Fettfällung	4
2.1.3.	Natriumsulfatfällung	4
2.1.4.	Gelfiltration	6
2.1.5.	Ionenaustauschchromatographie	8
2.2.	Antiserumgewinnung	9
2.3.	Nachweismethoden	9
2.3.1.	Zweidimensionale Immundiffusion	9
2.3.2.	Immunelektrophorese	9
2.3.3.	einfache radiale Immundiffusion	10
2.3.4.	Sedimentationsanalyse	11
2.4.	Markierung	11
2.4.1.	Methode	11
2.4.2.	Reagenzien	12
2.4.3.	Durchführung	12
2.4.4.	Proteingebundenes ^{125}J	12
2.4.5.	Sephadex G-25 Trennung	13
2.4.6.	Berechnung der spez. Aktivität u. Auswertung	13
2.4.7.	Statistische Methoden	16
2.5.	Versuchsbedingungen	16
2.5.1.	Tiermaterial	16
2.5.2.	Versuchsablauf	18
3.	Ergebnisse	21
3.1.	IgG-Präparation	21
3.1.1.	Originalchromatogramme	21
3.1.2.	Immunelektrophoretische Untersuchungen	21
3.1.3.	Sedimentationsanalyse	21
3.2.	IgG-Turnover und Halbwertszeitbestimmung	25
4.	Diskussion	31
4.1.	Kritische Besprechung der methodischen Voraussetzungen	31
4.2.	Kritische Besprechung der Ergebnisse	36
5.	Zusammenfassung	45
6.	Summary	46
7.	Literaturverzeichnis	47

1.

Einleitung und Literatur:

=====

Im Gegensatz zur A- und Hypogammaglobulinämie, bei der alle Immunproteine in hochgradig verminderter Form vorliegen, ist eine Defektdysproteinämie (Märki 1970) durch Mangel und Quantitätsverschiebung im Immunglobulinmuster gleichermaßen gekennzeichnet. Dieses Erscheinungsbild wird von Rosen u.a. (1961) wegen eines stark erhöhten Immunglobulin-M Spiegels bei hochgradig erniedrigtem IgG als Dysgammaglobulinämie bezeichnet.

Im Verlauf von routinemäßigen immunoelektrophoretischen Reihenuntersuchungen fiel 1965 ein HNL-Leghornhahn mit einer typischen Veränderung des Serumeiweißbildes auf (Brüggemann u.a. 1967). Neben einer starken Verminderung von Immunglobulin-G wurde eine deutliche Verstärkung der Präzipitationslinie für Immunglobulin-M beobachtet. Mit dem oben erwähnten Hahn und einigen weiteren Tieren wurde eine Zuchtlinie erstellt (Lösch 1972), in der dieses Immunglobulin-Muster gehäuft auftritt. Die Nachkommen dieser dysgammaglobulinämischen Tiere wurden hinsichtlich verschiedener biologischer und physikochemischer Kriterien charakterisiert (Brüggemann u.a. 1969; Oberdorfer und Lösch 1970; Brüggemann u.a. 1971; Lösch u.a. 1972; Lösch und Hoffmann-Fezer 1973; Schäfer 1972; Hoffmann-Fezer u.a. 1974; Lösch 1972). Ob die Ursache für diese Dysgammaglobulinämie in einem echten IgG-Synthesedefekt oder in einer erhöhten IgG-Abbaurate beziehungsweise in einem Protein-Verlustsyndrom zu suchen ist, war bisher nicht bekannt. Diese Frage zu klären und erstmals Daten über die Umsatzrate von IgG beim Huhn zu erfassen, stellen den Inhalt dieser Arbeit dar, zumal der Literatur keine exakten Angaben über das diesbezügliche biologische Verhalten von aviärem IgG zu entnehmen sind.

Nur von Leslie und Clem (1970) liegen überschlagsmäßige Berechnungen für den IgG-Umsatz beim normalen Haushuhn vor, die in der Diskussion näher besprochen werden sollen. Demgegenüber wurde die Halbwertszeit dieses Immunglobulins von mehreren Autoren bestimmt (siehe Tab.4, Seite 41). Patterson u.a. (1962) ermittelten eine durchschnittliche biologische Halbwertszeit von 1,4 Tagen. Im Gegensatz dazu geben Wostmann und Olson (1964) für konventionell gehaltene Hühner einen Wert von 4,3 Tagen, für keimfreie Tiere einen Wert von 4,2 Tagen an. Nach Untersuchungen von Leslie und Clem (1970) beträgt die biologische Halbwertszeit für IgG 4,1 Tage. Für eine Gruppe von bestrahlten Hühnern (725 R) fanden Frommel u.a. (1970) 2,1 Tage. Iványi u.a. (1964) bestimmten bei erwachsenen Hühnern eine Halbwertszeit von 1,55 Tagen, bei Junghühnern 2,0 Tage. Schließlich fand Phillips (1966) eine Halbwertszeit von 2,4 Tagen, wenn Truthahn-Gammaglobulin in diesbezüglich toleranten Hühnern abgebaut wird. Während Leslie und Clem ihre Untersuchungen an rein dargestelltem IgG (Leslie und Clem 1969) durchführten, gehen Patterson u.a., Iványi u.a. und Phillips von einer Gammaglobulin-Rohfraktion aus, die mittels Ammoniumsulfatfällung gewonnen worden war. Die Markierung dieses Gammaglobulingemisches erfolgte mit ^{131}J nach Weigle und Dixon (1959), nach der von Iványi und Hrabá (1963) modifizierten McFarlaneschen Markierungsmethode, beziehungsweise nach Francis u.a. (1951). Die von Leslie und Clem sowie von Frommel u.a. angewandten Methoden beruhen auf einer in vitro-Markierung von IgG mit ^{125}J beziehungsweise ^{131}J nach McConahey und Dixon (1966). Die Ergebnisse von Wostmann und Olson wurden an Hand von Tracer-Untersuchungen mit 1-C-14 Glycin ermittelt.

Die von uns eingesetzten Methoden der IgG-Präparation mit kombinierter Na_2SO_4 -Fällung, Ultrogel Trennung und Ionenaustauschchromatographie, sowie die in vitro-Markierung mit ^{125}J nach McConahey und Dixon (1966) werden im Abschnitt Material und Methoden eingehend besprochen.

2. Material und Methoden:
=====

2.1. IgG-Präparation

Die in Abb. 1 dargestellte Übersicht faßt die einzelnen Arbeitsschritte zusammen, die nötig sind, um aus der im Normalserum vorliegenden Vielzahl von Proteinen reines IgG zu gewinnen.

2.1.1. Normalserum, das von 18-21 Monate alten Hühnern am Geflügelschlachthof gewonnen worden war, diente der weiteren Aufarbeitung.

2.1.2. Die Fettfällung mit 5% Dextransulfat und 11,1% Calciumchlorid in Anlehnung an Burstein und Samaille (1959) erbrachte nach Zentrifugation klares fett-freies Serum im Überstand. Nach anschließender Dialyse gegen aqua dest und 0,9% NaCl (je 1 Teil Serum und 200 Teile Dialysierflüssigkeit) folgte die Aussalzung der Immunglobuline durch

2.1.3. Natriumsulfatfällung ⁺) (Kekwick 1940). Nach Benedict (1967) wurde dem nach der Dialyse bestimmten Volumen V_1 (siehe Abb. 1/III) zunächst 18% Na_2SO_4 zugegeben. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde anschließend in $1/2 V_1$ Boratpuffer ⁺⁺) gelöst, woraus sich V_2 ergab. Entsprechend diesem ersten Fällungsschritt folgten in abnehmender Konzentration Aussalzungen mit 14%, 14% und 0% Na_2SO_4 . Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf das Volumen des zuvor in Boratpuffer gelösten Präzipitats.

+) Natriumsulfat p.A.
wasserfrei
Firma Merck
Nr. 6649

+) Boratpuffer 0,36 M; pH 8,2	
H_3BO_3	51,5
NaCl	39,25
NaOH	6,3
NaN_3	1,0
$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	32,8
	} aqua dest. ad 5000

IgG · PRÄPARATION

I NORMALSERUM



II FETTFÄLLUNG DIALYSE

III Na_2SO_4 · FÄLLUNG

18 / 14 / 14 / 9 / (5) ^{*)} %

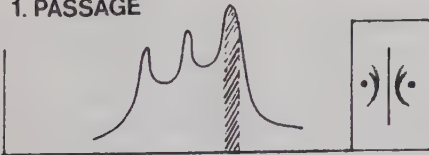


Na_2SO_4 · FÄLLUNG

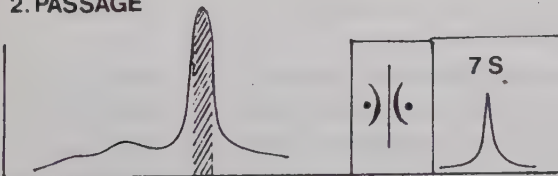
a $V_1 + 18\% \text{Na}_2\text{SO}_4$
in Lösung bringen
30 Min. stehen lassen
60 Min. 1500 UPM
↓
PRÄZIPITAT in $\frac{1}{2} V_1$
Boratpuffer lösen = V_2
↓

IV SÄULENCHROMATOGRAPHIE ULTROGEL AcA 34

a 1. PASSAGE



b 2. PASSAGE



b $V_2 + 14\% \text{Na}_2\text{SO}_4$
↓ siehe a
PRÄZIPITAT in $\frac{1}{4} V_1$
Boratpuffer lösen = V_3

c $V_3 + 14\% \text{Na}_2\text{SO}_4$
↓
PRÄZIPITAT siehe b

d Dialyse des gelösten Präzipitats
gegen Boratpuffer (24 Std.)

e Dialysat = $V_4 + 9\% \text{Na}_2\text{SO}_4$
↓
PRÄZIPITAT in 60 ml
Boratpuffer lösen

f Dialyse siehe d

V DEAE - CELLULOSE

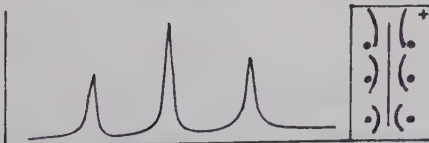


Abb. 1:

Schematische Darstellung der IgG-Präparation mittels kombinierter Na_2SO_4 -Fällung, Gelfiltration sowie Ionenaustauschchromatographie.

Der Überstand der 9%-igen Na_2SO_4 -Fällung siehe Abb. 1 III/e enthielt eine vorwiegend IgM-reiche Fraktion, die mit 5% Na_2SO_4 ausgefällt werden konnte. Den letzten beiden Fällungsschritten schloß sich eine Dialyse gegen Borstpuffer an. Alle Fällungsschritte inklusive Zentrifugation wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

- 2.1.4. Die so gewonnene IgG-Rohfraktion wurde anschließend säulenchromatographisch mittels Gelfiltration weiter aufgetrennt. Dieses Verfahren, von Flodin und Kilander (1962) erstmals beschrieben, erscheint für die Reinigung von Hühner IgG und IgM besonders geeignet (Benedict 1967) und beruht auf einer Trennung nach Molekulargewichtsunterschieden.

Während Benedict (1967) Sephadex G-200 als Trennmedium einsetzte, verwendeten Frommel u.a. (1970) Bio-Gel ⁺). Wir benutzten Ultrogel AcA-34 ⁺⁺), das bisher nicht für die Reinigung von Hühnerimmunglobulinen eingesetzt worden war.

Technische Voraussetzungen:

- a) Umlaufchromatographische Einrichtung der Firma LKB: Perpex Pumpe (10200); Trennsäule $9,6 \text{ cm}^2 \times 100 \text{ cm}$ mit Kühlmantel; UV-Durchflußphotometer (Uvicord I, 4701 A) zur Messung der Absorption von UV-Licht durch Flüssigkeiten im Durchfluß bei 254 nm.

⁺) Bio-Gel A 1,5 M; 200-400 Mesh, Bio-Rad Laboratories Richmond, Californien

⁺⁺) Ultrogel AcA-34, hergestellt von Industrie biologique Francaise; Vertrieb Firma LKB Produkter

Zwei-Farben Punktschreiber. Der Wechsel des Farbbandes erfolgt synchron mit dem Glaswechsel im Fraktionssammler. Fraktionssammler Ultrarec mit Kühlgehäuse (Temperatur 4° C).

b) Gelmatrix:

Ultrogel AcA-34, bestehend aus 3% Acrylamid und 4% Agarose. Fraktionierungsbereich 20.000 - 400.000 Daltons.

Durchmesser der gequollenen Gelperlen 60 - 140 µm. Ultrogel AcA-34 ist in vorgequollener Form im Handel erhältlich und kann nach zweimaligem Waschen im später verwendeten Puffer sowie nach Entfernen gelöster Gase in die Trennsäule zum Packen verbracht werden.

Der Durchfluß liegt hierbei ca. 10% über der später verwendeten Elutionsgeschwindigkeit.

c) Puffer: Boratpuffer pH 8,2; 0,36 molar (siehe S.4)

d) Durchführung:

4-6 ml einer 5-7%-igen Proteinlösung, die zuvor 45 Minuten mit 15.000 UPM bei 4°C zentrifugiert und anschließend filtriert worden war, wurden absteigend mittels Pumpe durch das Säulensystem geführt. Der Durchfluß betrug in der Regel 22-25 ml/Stunde. Die fraktioniert gesammelten Eluate (4-5 ml/Glas) konnten an Hand des Farbbandwechsels auf dem Chromatogramm identifiziert werden. Gewünschte Fraktionen wurden gesammelt und in einer Ultrafiltrationszelle ⁺⁾ auf die gewünschte Proteinkonzentration eingeeengt und erneut mittels Ultrogel-AcA-34 chromatographiert. Die Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration im Serum wurde mit der Biuretmethode ⁺⁺⁾ durchgeführt.

+) Firma Amicon
Modell 202
Diaflo-Membran PM-10

++) Merckotest
Gesamteiweiß
(Biuretmethode)
Art. Nr. 3327

2.1.5. Ionenaustauschchromatographie (siehe Abb. 1/V)

a) Grundausrüstung: siehe Gelfiltration S. 6

b) Ionenaustauscher: DE-52 ⁺)

c) Trennsäule: 1,7 cm² x 30 cm ⁺⁺)

d) Puffer:

1. Startpuffer

α) Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 17,9 g ad 1000 ml
aqua dest; pH 9,3; 0,05 M;

β) NaH₂PO₄ x H₂O; 6,9 g ad 1000 ml aqua dest.;
pH 4,2; 0,05 M;

Zugabe von β zu α bis pH 8,0 erreicht ist. Als
Bakteriostatikum wurden 7,5 ml n-Butanol ad
1000 ml Puffer zugegeben.

2. Endpuffer zum Waschen

Na₃PO₄ x 12 H₂O; 114,03 g ad 1000 ml aqua dest.;
pH 12,2; 0,3 M;

e) Vorbereitung des Austauschers

Zunächst wurden 60 g Trockensubstanz DE-52 in 0,5
normaler HCl aufgeschwemmt. Nach 30 Minuten wurde
die Salzsäure über eine Wasserstrahlpumpe abge-
nutzt. Der sich bildende Austauscherrest wurde
anschließend solange mit aqua dest. gewaschen, bis
der pH in der abgenutzten Flüssigkeit pH 4,0 er-
reicht hatte. Der ganze Vorgang wurde mit 0,5 nor-
maler NaOH wiederholt, wobei das Äquilibrieren mit
dem später verwendeten Startpuffer erfolgte, bis
ein pH von 8,0 im abgesaugten Puffer herrschte. Die
bei der Herstellung von DE-52 anfallenden "Fines"
wurden abschließend entfernt. Hierzu erfolgte noch-
mals das Aufschwemmen des Austauschers im Start-
puffer. Die auf der Oberfläche schwimmenden feinen
Partikel wurden zusammen mit dem klaren Pufferüber-
stand abgesaugt. Das nasse abgesetzte Volumen wurde
schließlich auf 150% mit Startpuffer aufgefüllt.
Diese Präparation wurde nun unter ständigem Rühren
in eine Säule mit aufgeschraubtem Reservoir ⁺⁺⁺) ein-
gefüllt.

⁺) Anionenaustauscher DE-52 microgranular
Firma Whatman

⁺⁺) Borsilikatsäule K 15/30
Firma Pharmacia Fine Chemicals
Uppsala Schweden

⁺⁺⁺) R-15; 300 ml Fassungsvermögen
Firma Pharmacia Fine Chemicals

Die Packung erfolgte mit $0,9 \text{ kg/cm}^2$ Stickstoffüberdruck.

f) Durchführung:

Ungefähr $53 \text{ mg} \approx 1 \text{ ml}$ wurden auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluß betrug 18 ml/Stunde . Die Trennung erfolgte bei Zimmertemperatur. Der in Abb. 3c gezeigte 1. Peak (p_1) wurde mit Phosphatpuffer pH 8,0 eluiert. Mit Na_3PO_4 (0,3 M; pH 12,2) wurde nachgewaschen. Hiermit wurden die beiden folgenden Peaks gewonnen (Abb. 3c, p_2 , p_3).

2.2. Antiserumgewinnung

Durch Immunisierung einer Ziege mit isoliertem IgG (siehe Abb. 1: 4b) nach Martin und Leslie (1974) wurde γ -ketten-spezifisches Antiserum nach Absättigung mit Serum dysgammaglobulinämischer Hühner ⁺⁾ gewonnen. Die Absättigung erfolgte im Verhältnis 2 Teile Ziegenserum zu 1 Teil Serum dysgammaglobulinämischer Hühner.

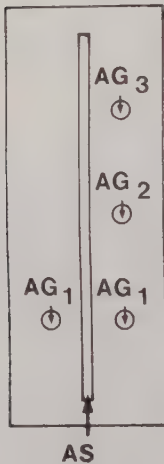
2.3. Nachweismethoden

2.3.1. Zur Überprüfung der Antiserumspezifität beziehungsweise der Reinheit unserer IgG-Präparation verwendeten wir die zweidimensionale Immundiffusion nach Ouchterlony (1948) und

2.3.2. die Immunelektrophorese (IE) in der von Scheidegger (1955) entwickelten Mikromethode. Zum Verständnis der immunelektrophoretischen Analysen in Abb.5 Nr. 4 und 5 sei auf eine von uns praktizierte Antiserum-sparende Antigenauftragetechnik hingewiesen.

⁺⁾ IgG $\leq 1 \text{ mg/dl}$; IgM $> 200\%$;
(dl = 100 ml)

Wenn hochgereinigte Proteine geprüft werden, die eine einheitliche immunoelektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen, können mehrere Antigenlöcher entlang der Antiserumrinne beschickt werden. Das Entsprechende gilt, wenn Proteingerische gegenüber einem monovalenten Antiserum getestet werden.



Nebestehende Abbildung verdeutlicht links der Antiserumrinne die übliche und rechts die von uns praktizierte Auftragstechnik

2.3.3. Mancini-Test

Zur Bestimmung der Serum-IgG und IgM-Konzentrationen wurde die eindimensionale Immundiffusionsmethode nach Mancini u.a. (1965) modifiziert nach Gruber (1968) angewandt. An Hand von Standard-IgG-Eichkurven (1% Protein) wurden die Immunglobulinkonzentrationen ermittelt. Die IgM-Serumkonzentration wurde in % der Norm angegeben. Als Standard diente ein Serumpool von 30 adulten Hühnern.

Für IgG liegt die untere Grenze der quantitativen Erfassbarkeit bei 5 mg/dl. Werte < 5 mg/dl können nur überschlagsmäßig angegeben werden. Deshalb wurden Tiere ausgesucht, deren IgG-Serumkonzentration ≥ 5 mg/dl betrug.

2.3.4. Sedimentationsanalyse ⁺)

Die Untersuchungen wurden mit einer Ultrazentrifuge Spinco, Modell E der Firma Beckman Instruments durchgeführt.

Arbeitsbedingungen

Umdrehungszahl: 52000 U/Min

Temperatur: im Bereich von 20° C

Lösungsmittel: Boratpuffer (siehe S. 4)

Proteinkonzentration: 1%

Schlierenoptik

Die ermittelten Sedimentationskoeffizienten wurden auf Standardbedingungen (20° C und Wasser) = S_{20}^w korrigiert.

2.4. Markierung

- 2.4.1. Das von uns verwendete Verfahren zur radioaktiven Markierung von IgG wird von McConahey und Dixon (1966) beschrieben und beruht auf der Oxidation von Tyrosingruppen durch Chloramin-T.

+) Für die Durchführung der Sedimentationsanalyse möchten wir Herrn PD. Dr. Kolb (Institut für klinische Chemie, Teil der Forschungsgruppe Diabetes am Schwabinger Krankenhaus; Leiter Professor Dr. Mehnert) herzlich danken.

2.4.2. Reagenzien

Sörensen-Phosphatpuffer 0,05 und 0,5 molar;
Chloramin-T-Lösung (1 mg/5 ml 0,05 M Phosphatpuffer);
Natriummetabisulfit (1 mg/ 5 ml 0,05 M Phosphatpuffer);
KJ-Lösung (0,5 mg/0,5 ml 0,05 M Phosphatpuffer);
Veronalpuffer 0,07 M, pH 8,6;
 ^{125}J Firma Hoechst +);

2.4.3. Durchführung

Zunächst wurde der radioaktive Inhalt der Ampulle mit 0,25 ml 0,5 M Phosphatpuffer gemischt und in ein Zentrifugenglas ++), das 20 mg IgG in 2 ml 0,05 M Phosphatpuffer enthielt, überführt. Die leere Ampulle wurde mit 0,25 ml 0,5 M Phosphatpuffer gespült und obigem Gemisch zugegeben. Anschließend wurden 100 µg Chloramin-T in 0,05 M Phosphatpuffer tropfenweise unter ständigem Rühren zugegeben. Nach fünf Minuten wurden 100 µg Natriummetabisulfit in 0,05 M Phosphatpuffer sowie 0,5 ml Kaliumjodid in 0,05 M Phosphatpuffer beigemischt.

2.4.4. Anteil von proteingebundenem ^{125}J

0,25 ml einer verdünnten ^{125}J -markierten IgG-Lösung wurden mit derselben Menge Normalserum als Trägersubstanz vermischt. Danach wurden 0,5 ml 20%ige Trichloroessigsäure zugesetzt. Die Differenz der Aktivität +++)) aus dem nach Zentrifugation gewonnenen Präzipitat und dem Überstand gibt Aufschluß über das Verhältnis von freiem zu proteingebundenem Jod.

+) Volumen 0,0088 ml; Gesamtaktivität 2 mCi; Aktivitätskonzentration 12 Ci ^{125}J / mgJ; Halbwertszeit 60 Tage;

++) Firma Sarstedt Nr. 96/16;

+++)) γ -Zähler, Firma Packard

2.4.5. Darstellung des ^{125}J -markierten IgG:
Trennmedium: Sephadex G-25;
Glassäule: $6,6 \text{ cm}^2 \times 60 \text{ cm}$;
Packung der Säule: hydrostatisch;
Puffer: Veronalpuffer $0,07 \text{ M}$; $\text{pH } 8,6^{+)}$;
Die markierte Substanz wurde auf die gerade
'trockenlaufende' Säule aufgebracht, anschließend
wurde kontinuierlich mit $0,07 \text{ M}$ Veronalpuffer nach-
gewaschen. Die Eluate wurden 3 ml -weise in Zentri-
fugenröhrchen aufgefangen. Durch Bestimmung der
 ^{125}J -Aktivität der Proben ließ sich die markierte
IgG-Fraktion ermitteln. $6,1 \text{ ml}$ Probenmaterial
(= $10,3 \text{ mg}$ IgG) wurden für die Durchführung der
weiteren Versuche ausgewählt.

2.4.6. Berechnung der spezifischen Aktivität:
Vor der Auszählung $^{++)}$ der Impulse im Reaktionsge-
misch wurde die Impulszahl für die reine aktive Sub-
stanz (Ampulle mit $2 \text{ mCi } ^{125}\text{J}$) bestimmt; Verluste (un-
vermeidbare Reste in der Ampulle beziehungsweise in
den verwendeten Pipetten) wurden gleichfalls über die
Impulsbestimmung festgestellt und berücksichtigt, so
daß die Impulszahl des Reaktionsgemisches direkt auf
die Aktivität der Reinsubstanz von 2 mCi bezogen wer-
den konnte. Die spezifische Aktivität errechnete sich
aus der ermittelten Impulszahl/mg IgG, woraus ein Wert
von $53 \text{ } \mu\text{Ci/mg}$ IgG hervorging.

+) Veronal-Puffer: Barbitol-Na; Mol.Gew. 206,18;
Merck Nr. 6318
 $0,1 \text{ M} = 20,6 \text{ g ad } 1000 \text{ ml aqua dest.}$
 $7 \text{ Teile } 0,1 \text{ M} + 3 \text{ Teile aqua dest.}$
 $\text{pH } 8,6$ mit 1 n HCl eingestellt;

++) Strahlenmeßgerät FH-90
Szintillationszähler FH-902
 β -Meßkopf FH-421/Z2, mit NaJ-Bohrlochkristall
der Firma Friesseke und Höpfner, Erlangen Bruck;

Für die Umrechnung der in den Blutproben (siehe Seite 18) gezählten Impulse auf Curie entnehmen wir der später applizierten markierten Testsubstanz, (wovon 100 ml 172,6 mg IgG enthielten) 0,005 ml und verdünnten sie mit 5 ml Veronalpuffer. 0,25 ml dieser Lösung wiesen 6748 Impulse pro Minute auf. Dies entspricht einem IgG-Gehalt von $4,31 \times 10^{-4}$ mg und einer Aktivität von 0,023 μ Ci. Die im Blut gemessene Aktivität wurde auf die IgG-Serumkonzentrationen der Einzeltiere bezogen und als spezifische Aktivität in μ Ci/mg IgG in semilogarithmischem Maßstab auf die Ordinate gegen die Zeit aufgetragen. Verfolgt man die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit, so ergab sich folgende Funktion (siehe Abb. 2).

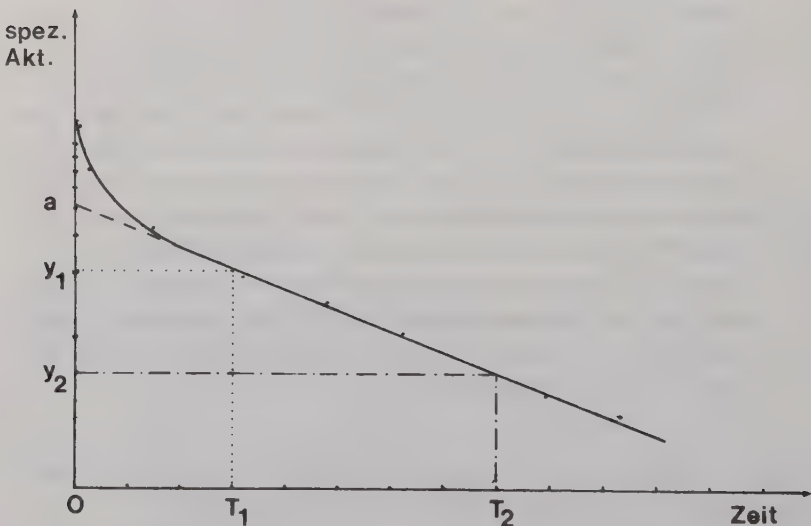


Abb. 2: Schematische Darstellung der Plasmaeliminationskurve eines radioaktiv markierten Proteins nach intravenöser Applikation

y_1 = spezifische Aktivität zum Zeitpunkt der Entnahme T_1

y_2 = spezifische Aktivität zum Zeitpunkt der Entnahme T_2

a = extrapolierte spezifische Aktivität zum Zeitpunkt 0

Ordinate in logarithmischem, Abszisse in dekadischem Maßstab.

An Hand dieser schematischen Darstellung soll die weitere Berechnung der relevanten Stoffwechselgrößen von IgG (Turnoverkonstante, Turnoverzeit, a^+), Pool, Turnover und Halbwertszeit) erklärt werden. Der Kurvenverlauf ist gekennzeichnet durch einen rasch abfallenden Schenkel. Nach gleichmäßiger Verteilung der radioaktiv markierten Substanz stellt sich ein steady state innerhalb der einzelnen Kompartimente ein. Im Kurvenverlauf drückt sich diese Gleichverteilung durch den linearen Abfall der spezifischen Aktivität aus; sie stellt eine wichtige Voraussetzung für die weiteren Berechnungen dar.

k wird als Turnoverkonstante bezeichnet und errechnet sich aus:

$$k = \frac{1}{T_1 - T_2} \times 2,303 (\log y_1 - \log y_2)$$

k wird in Stunden $^{-1}$ angegeben

Der reziproke Wert der Turnoverkonstanten = $1/k$ gibt die Turnoverzeit an, also den Zeitraum, der benötigt wird, um den Gesamtpool einmal umzusetzen.

Der Wert a wurde durch lineare Regression der im linearen Abschnitt liegenden Meßwertkoordinaten ermittelt und gibt die spezifische Aktivität zum Zeitpunkt der Verabreichung an (siehe Abb. 2)

Die Poolgröße P ergibt sich aus dem Verhältnis von applizierter Dosis und a und wird in mg angegeben.

+) Definition siehe Abb. 2

Aus der Poolgröße und Turnoverkonstanten läßt sich die pro Zeiteinheit umgesetzte Menge IgG errechnen.

$$\text{Turnover} = P \times k \text{ (mg} \times \text{Std.}^{-1}\text{)}$$

Die Halbwertszeit errechnet sich aus dem Quotienten von 0,693 und k.

$$\text{Halbwertszeit} = \frac{0,693}{k} \text{ (Stunden)}$$

Die theoretischen Grundlagen sind von Shipley und Clark (1972) beschrieben.

2.4.7. Statistische Methoden

Zum Vergleich von Stichprobenmittelwerten wurde der U-Test von Wilcoxon, Mann, Whitney herangezogen.

2.5. Versuchsbedingungen

2.5.1. Tiermaterial

Je fünf zwei bis neun Monate alte Hühner der dysgamma-globulinämischen Zuchtlinie, sowie normale Kontrolltiere, die unter identischen Bedingungen aufgezogen worden waren, wurden für die vorliegenden Untersuchungen eingesetzt (siehe Tab. 1). Alters- und geschlechts-gleiche Paare mit vergleichbarem Immunglobulinmuster wurden ausgewählt. Die Tiere waren unter konventionellen Bedingungen auf Gitterrosten aufgezogen worden. Handels-übliches pelletiertes Legehennenalleinfutter I nach DLG-Standard und Wasser standen zur freien Aufnahme zur Verfügung. Zehn Tage vor Versuchsbeginn wurde anstelle von

TIER MATERIAL					
	TIER (Nr.)	ALTER (Mo.)	KGW (g)	IgG (mg/dl.)	IgM (%)
D Y S	6683 ♀	9	1520	8.7	360
	6695 ♀	8	1415	22.5	450
	7753 ♀	4	1231	9.2	430
	823 ♂	3	1665	11.8	250
	871 ♀	3	1000	5.9	420
	$\bar{x}$		1366	11.6	382
	S %		18	55	21
K O	2295 ♀	8	1995	674.0	100
	3309 ♀	8	1840	547.0	160
	3317 ♀	4	1378	817.0	110
	0 ♂	3	1035	598.0	75
	850 ♀	2	1288	624.0	90
	$\bar{x}$		1507	652.0	107
	S %		26	15	30

Tabelle 1:

Alter, Körpergewicht und Serumimmunglobulin-
konzentrationen (IgG in mg/100 ml; IgM in %
der Norm) von 5 dysgammaglobulinämischen (DYS)
und 5 Kontrollhühnern (KO).

$\bar{x}$ = Mittelwert; s% = Standardabweichung in %

Wasser eine 0,1%ige Lugolsche Lösung ⁺⁾ angeboten, um eine Aufnahme von freigesetztem radioaktivem Jod durch die Schilddrüse zu verhindern. Die Tiere wurden einzeln in selbstkonstruierten Einmalkäfigen unter den Abzügen des Isotopenlabors gehalten. Die schadloße Beseitigung kontaminierter Abfälle inklusive Unterbringungsmaterial war somit gewährleistet.

2.5.2. Versuchsablauf

Einen Tag nach der IgG-Markierung wurden den Versuchstieren 0,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht des markierten IgG in die Vena cutanea ulnaris injiziert. Blutproben wurden 15 Minuten, 5, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden nach der Applikation entnommen. Hierzu wurden kleine Venen der Brustwand mit einem Skalpell punktiert und jeweils 0,1 ml Blut mit einer Pipette ⁺⁺⁾ passiv entnommen. Die Probe wurde ohne Verlust in die Zählgefäße ⁺⁺⁺⁾ überführt. Die Pipetten wurden zweimal mit 0,9%iger NaCl + EDTA durchgespült. Im Anschluß an die Entnahme erfolgte die Zählung der Impulse (2 Minuten/Probe). Zur Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen wurden vor Beginn und am Ende des Versuchs 8 ml Blut zur Serumgewinnung entnommen. Mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion wurde die IgG-Serumkonzentration der Versuchstiere bestimmt (siehe Tab. 2).

+) 3 Teile KJ	} davon 1 ml ad 1000 ml Brunnenwasser
2 Teile J ₂	
45 Teile aqua dest.	

++) Acupetten Firma DAEDE (Blutpipetten für den Einmalgebrauch)

+++) Reagenzgläser Firma Sarstedt Nr. 95/16

IgG - KONZENTRATION			
D Y S		K O	
TIER Nr.	mg/100ml	TIER Nr.	mg/100 ml
6 6 8 3	9.7	2 2 9 5	6 8 2.0
6 6 8 3*	7.8	2 2 9 5*	6 6 7.0
$\bar{x}$	8.7	$\bar{x}$	6 7 4.0
6 6 9 5	23.7	3 3 0 9	5 3 0.0
6 6 9 5*	2 1.4	3 3 0 9*	5 6 4.0
$\bar{x}$	22.5	$\bar{x}$	5 4 7.0
7 7 5 3	9.5	3 3 1 7	7 9 4.0
7 7 5 3*	8.9	3 3 1 7*	8 4 0.0
$\bar{x}$	9.2	$\bar{x}$	8 1 7.0
8 2 3	1 1.4	0	5 8 3.0
8 2 3*	1 2.2	0*	6 1 3.0
$\bar{x}$	1 1.8	$\bar{x}$	5 9 8.0
8 7 1	5.8	8 5 0	6 2 6.0
8 7 1*	6.0	8 5 0*	6 2 2.0
$\bar{x}$	5.9	$\bar{x}$	6 2 4.0

Tabelle 2:

Serum IgG-Konzentrationen (mg/100 ml) der dysgammaglobulinämischen und Kontrolltiere vor Versuchsbeginn und zu Versuchsende (*)

$\bar{x}$ = Mittelwert der Doppelbestimmung

Für die dysgammaglobulinämischen Hühner ergab sich ein Wert von $\bar{x} = 11,6$ mg IgG/100 ml Serum. Die Kontrolltiere wiesen eine IgG-Serumkonzentration von 652 mg IgG/100 ml auf. Für die Ermittlung der spezifischen Aktivität verwendeten wir den jeweiligen Mittelwert, der sich aus der vor Beginn des Versuchs und zu Versuchsende bestimmten IgG-Serumkonzentration ergab (siehe Tab. 2). Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die Serum-IgG-Konzentrationen während des Versuchszeitraums konstant geblieben waren.

Frisch gewonnener Kloakeninhalt wurde mit und ohne Trasylol ⁺) und mit und ohne IgG-Zusatz immunoelektrophoretisch analysiert. IgG wurde selbst dann noch eindeutig erfaßt, wenn die Konzentration um 1/ 50 unter dem Wert lag, der zu erwarten gewesen wäre, wenn die IgG-Serumkonzentration der dysgammaglobulinämischen Tiere auf Grund eines enteralen Proteinverlustsyndroms zustande gekommen wäre.

+) Trypsininhibitor 100000 KIE
Firma Bayer

7. Ergebnisse:
=====

3.1. IgG-Präparation

- 3.1.1. Die in Abb. 3a,b,c gezeigten Chromatogramme geben die in Abb. 1 - IV, V schematisch dargestellten Elutionskurven der ersten beiden Ultrogelpassagen, sowie der DEAE-Cellulose Trennung im Original wieder.
- 3.1.2. Die durch die einzelnen Arbeitsschritte erreichte IgG-Isolierung aus Vollserum geht aus der immunoelektrophoretischen Reinheitsüberprüfung ⁺⁾ hervor (siehe Abb. 5). Beginnend bei Normalserum (Objektträger Nr. 1) ließen sich eine Vielzahl von Präzipitationslinien nachweisen. Nach Na_2SO_4 -Fällung (Objektträger Nr. 2) fanden sich vier Präzipitationsbögen. Peak III der ersten Ultrogelpassage (Objektträger Nr. 3) war vorwiegend IgG-haltig, jedoch durch eine zweite Komponente geringfügig verunreinigt. Peak III' (d.h. Peak III nach der zweiten Ultrogelpassage = Objektträger Nr. 4/1) stellt sich ebenso wie die drei Fraktionen der DE-52 Trennung (Abb. 3c- p_1, p_2, p_3) als reines IgG dar. Letztere unterschieden sich deutlich in ihrer anodischen Wanderungsgeschwindigkeit. Der zuerst eluierte Peak p_1 wies die niedrigste negative Ladung auf; p_3 wanderte am stärksten in Richtung Anode.
- 3.1.3. Die sedimentationsanalytische Überprüfung von Peak III' aus Abb. 3b ergab, daß es sich hierbei um ein einheitlich sedimentierendes Protein von $6,9 S_{20W}$ handelt (siehe Abb. 4 und 8).

⁺⁾ Alle dargestellten Immunelektrophoresen wurden mit polyvalentem Antihühnerserum vom Kaninchen entwickelt.

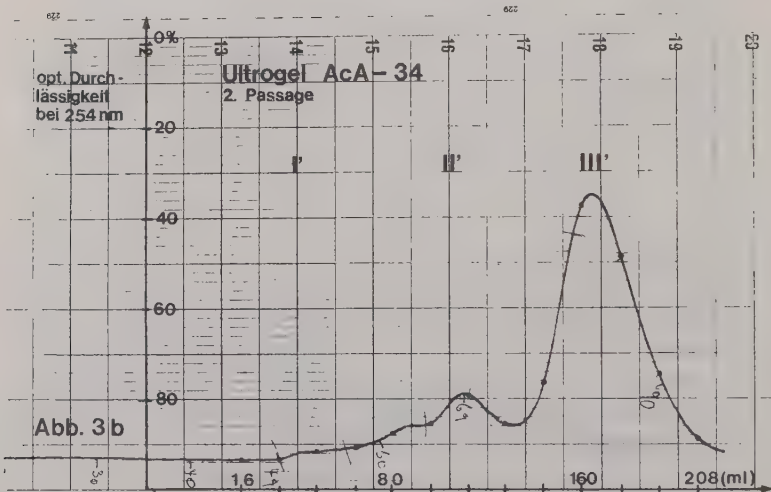
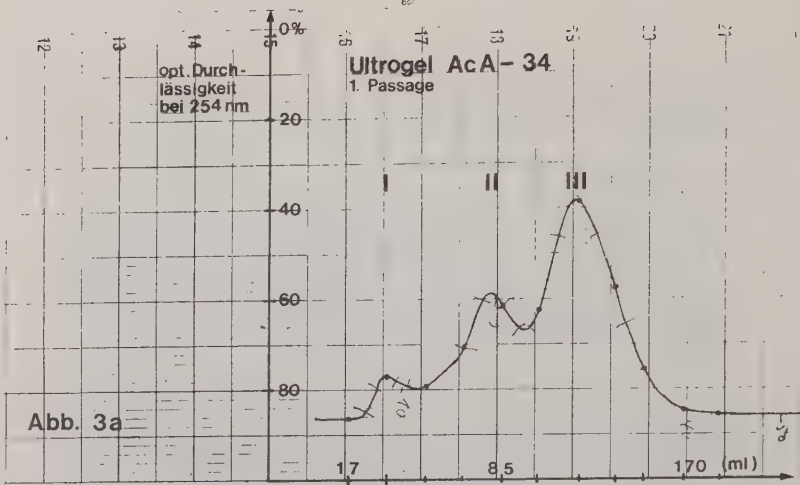


Abb. 3: IgG-Präparation mittels Gelfiltration
(Ultrogel AcA-34); 0,36 M Boratpuffer, pH 8,2;
Säule 9,2 cm² x 100 cm;

- a) 3 ml 6%ige IgG-Rohfraktion nach Na₂SO₄-Fällung
b) 4 ml 6%iges Eluat aus Peak III, Abb. 3a
(Originalchromatogramme)

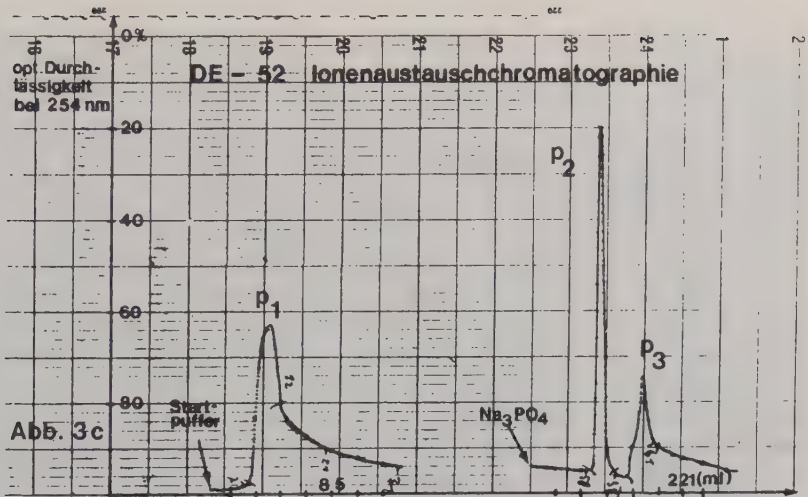


Abb. 3c: Anionenaustauschchromatogramm von Peak III' aus Abb. 3b; DEAE-Cellulose DE-52; Säule $1,7 \text{ cm}^2 \times 30 \text{ cm}$; Startpuffer $0,05 \text{ M}$ Phosphatpuffer, pH 8,0; Endpuffer $0,3 \text{ M}$ Na_3PO_4 -Puffer, pH 12,2;

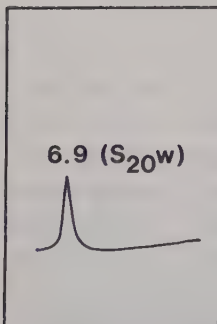


Abb. 4: Sedimentationsanalyse (siehe Material und Methoden 2.3.4.) von III' der 2. Ultrogelpassage in Abb. 3b. (Original siehe Abb. 8)

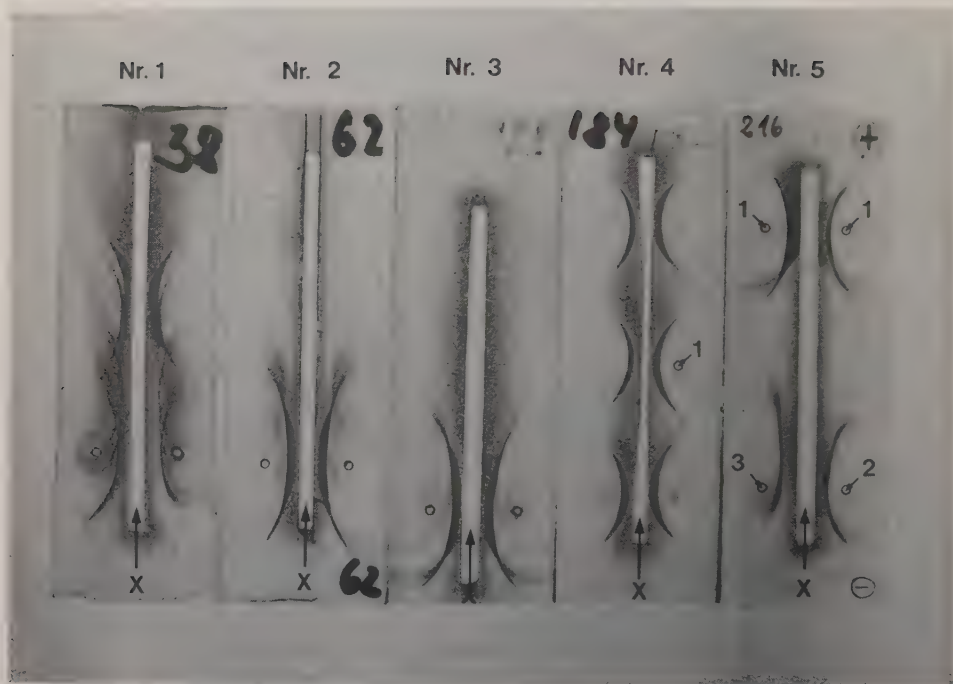


Abb. 5: Immunelektrophoretische Ergebnisse:

Nr.1	Normalserum
Nr.2	IgG-Rohfraktion nach 9%iger Na_2SO_4 -Fällung
Nr.3	Peak III der 1. Passage (siehe Abb. 3a/III)
Nr.4/1	Peak III' der 2. Passage (siehe Abb. 3b/III')
Nr.5/1	Peak I der DEAE-Trennung (siehe Abb. 3c/p1)
Nr.5/2	Peak II der DEAE-Trennung (siehe Abb. 3c/p2)
Nr.5/3	Peak III der DEAE-Trennung (siehe Abb. 3c/p3)

Kommentar zu den Objektträgern Nr. 4 und Nr. 5:

- 1) Auftragsbedingungen siehe Material und Methoden
- 2) Die in 4 außer bei Nr. 4/1 aufgetragenen IgG-fractionen sind hier ohne Belang.

X = Polyvalentes Antiserum gegen Hühnerserumproteine

Eine Aggregatbildung ist somit ausgeschlossen.

(Der Vollständigkeit halber seien die Ergebnisse von Peak I und II aus Abb. 3a nach der zweiten Ultragel-passage erwähnt. Die aus I gewonnene Fraktion ergab zwei deutlich abgesetzte Komponenten ($S_{20w} = 16$ und $26,4$). Die zweite Passage von Peak II zeigte eine Hauptkomponente mit $S_{20w} = 9,7$ und eine deutlich abgesetzte Schulter mit $S_{20w} = 7,3$ (siehe Abb. 8).

3.2. IgG-Turnover und Halbwertszeitbestimmung bei normalen und erblich dysgammaglobulinämischen Hühnern:

Um die Hauptunterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen deutlich zu machen, wurden zunächst die Regressionsgeraden für die Plasmaelimination von ^{125}J -IgG bei beiden Kollektiven an Hand der Meßwertkoordinaten der Einzeltiere im Zeitintervall 50 - 140 Stunden erstellt (siehe Abb. 6).

Der für beide Geraden angegebene 95% Vertrauensbereich der Mittelwerte von $\bar{x}$ (DYS)⁺ = 95 Stunden und $\bar{x}$ (KO)⁺⁺ = 87,5 Stunden ergab eine größere Streubreite bei den dysgammaglobulinämischen Tieren. Die extrapolierte Ausgangsaktivität zum Zeitpunkt Null betrug für die Kontrollgruppe $0,05 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ IgG; der entsprechende Wert der dysgammaglobulinämischen Tiere lag bei $1,9 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ IgG. Bei nahezu identischem Abfall der Kurven wurde von den dysgammaglobulinämischen Tieren nach 140 Stunden die spezifische Aktivität von $0,57 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ IgG erreicht, bei den Kontrollen ist sie nach diesem Zeitraum auf $0,012 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ IgG abgefallen. Aus Abb. 7 kann der Verlauf der Einzelkurven ersehen werden.

In Tab. 3 sind die aus der jeweiligen ^{125}J -IgG-Elutionskurve errechneten Größen (siehe Material und Methoden) zusammengestellt. Es ist ersichtlich, daß zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Turnoverzeit ($1/K$) und der biologischen Halbwertszeit ($T/2$) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, während

+) ++) $\bar{x}$ für den Meßzeitraum 48 - 144 Stunden nach der Applikation

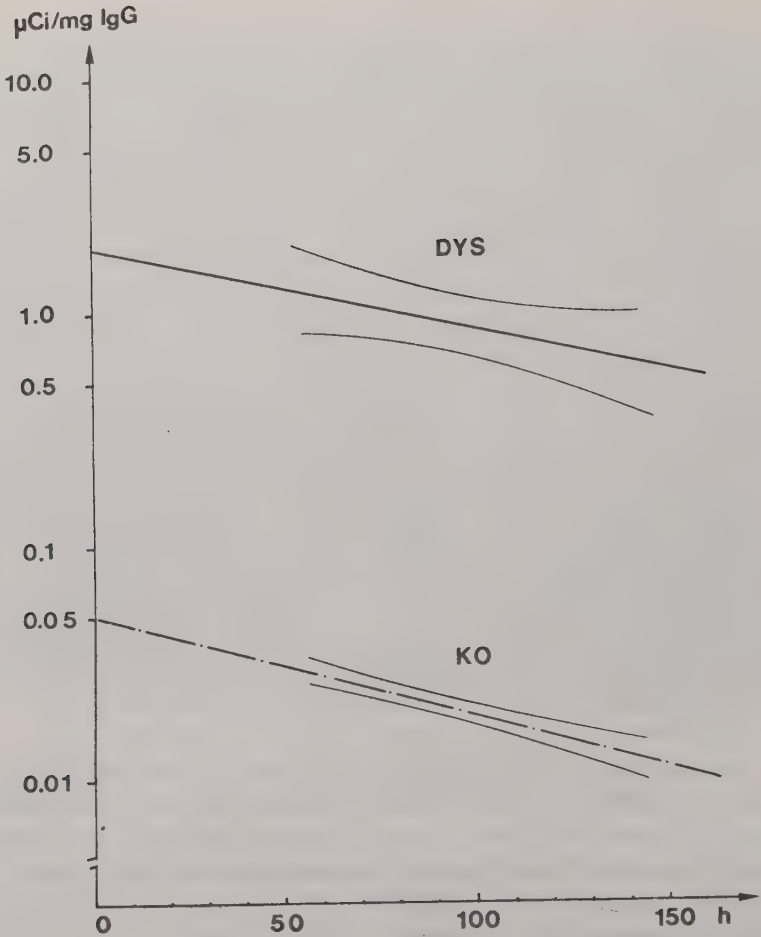


Abb. 6: Gemittelte Plasmaeliminationskurven von ^{125}I -markiertem IgG der dysgammaglobulinämischen (=) und der Kontrollgruppe (=) mit dem jeweiligen 95% Vertrauensbereich für die beiden Regressionsgeraden

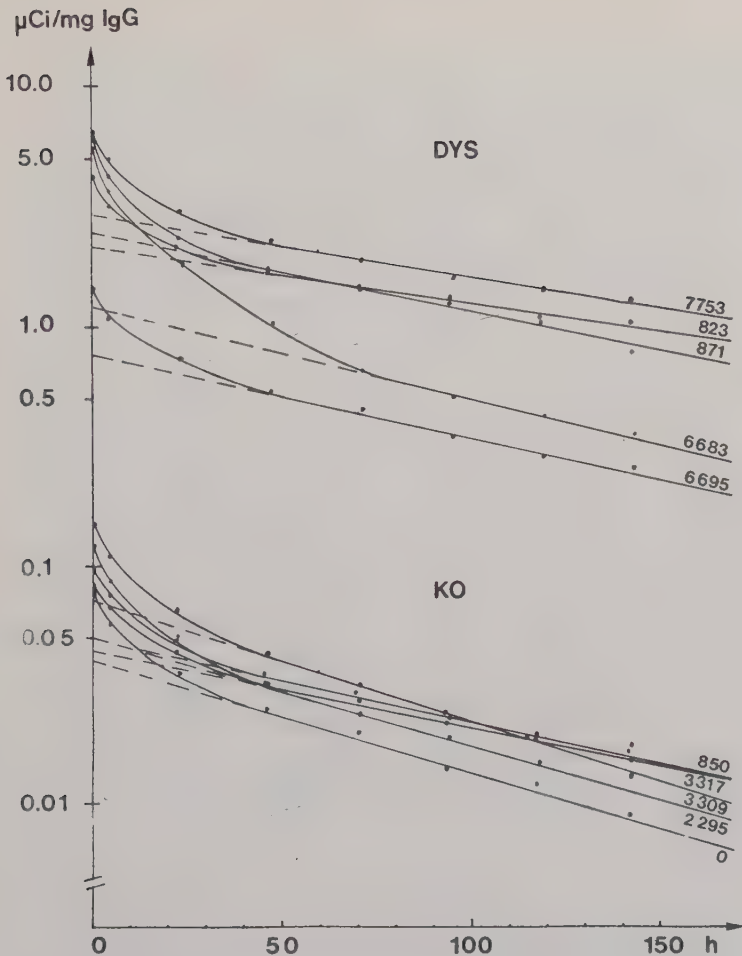


Abb. 7: Einzeldarstellung der Plasmaeliminationskurven von ^{125}I -markiertem IgG nach intravenöser Verabreichung

DYS = dysgammaglobulinämische Tiere: 7753, 823, 871, 6683, 6695;

KO = Kontrolltiere: 850, 3317, 3309, 2295, 0;

HWZ - IgG						
	TIER (Nr.)	IgG (mg/dl.)	1: k (Std.)	POOL (mg)	TURNOVER (mg/Std.)	T _{1/2} (Tage)
DYS	6683 ♀	8.7	116.83	33.2	0.282	3.4
	6695 ♀	22.5	127.08	48.6	0.379	3.7
	7753 ♀	9.2	169.17	11.2	0.066	4.9
	823 ♂	11.8	191.56	20.4	0.106	5.5
	871 ♀	5.9	147.19	10.6	0.071	4.3
$\bar{x}$		• 11.6	150.36	• 24.8	• 0.180	4.3
±S%		55	20	65	78	19
KO	2295 ♀	674.0	103.79	1039.0	9.974	3.0
	3309 ♀	547.0	93.38	672.9	7.200	2.7
	3317 ♀	817.0	147.19	830.9	5.567	4.3
	0 ♂	598.0	94.05	685.5	7.266	2.7
	850 ♀	624.0	128.97	690.2	5.314	3.8
$\bar{x}$		• 652.0	113.47	• 783.7	• 7.064	3.3
±S%		15	20	19	26	21

Tab. 3: IgG-Serumkonzentration (mg/dl), Turnoverzeit = 1:k (Stunden), Pool (mg), Turnoverrate (mg/Stunde) und biologische Halbwertszeit (T/2) von IgG für 5 dysgamma-globulinämische und 5 Kontrollhühner

$\bar{x}$ = Mittelwert

s% = Standardabweichung in %

- = Signifikanz für die Differenz der Mittelwerte von IgG-Serumkonzentration, Pool und Turnover ($p < 0,02$)

bezüglich Pool (mg IgG pro Versuchstier) und Turn-over (mg IgG pro Stunde) die Werte bei den Kontrolltieren signifikant höher waren als bei den dysgamma-globulinämischen Tieren (siehe Tab. 3).

Beispielsweise verhalten sich die Mittelwerte der Halbwertszeit zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe wie 0,8 zu 1 und die entsprechenden Werte bezüglich des IgG-Umsatzes wie 39 zu 1.

SEDIMENTATIONSANALYSE

-30-



Abb. 8: Sedimentationsanalytische Ergebnisse von Peak I, Peak II aus Abb. 3a nach der zweiten Ultrazentrifugierung, sowie Peak III' aus Abb. 3b. Laufrichtung von links nach rechts, mit Anfänge des Auf-

4. Diskussion:
=====

4.1. Kritische Besprechung der methodischen Voraussetzungen:

Bei Umsatzuntersuchungen im Fließgleichgewicht unter Verwendung radioaktiv markierter Substanzen ist es von entscheidender Bedeutung, daß erstens das zu untersuchende Material in Reinform vorliegt, zweitens das Protein in seinen physikochemischen und antigenen Eigenschaften im Verlauf der Präparation und durch die Markierung nicht beeinträchtigt wird und außerdem gewährleistet ist, daß kein Verlustsyndrom bezüglich des untersuchten Proteins vorliegt. Darüber hinaus muß gesichert sein, daß die IgG-Spiegel auch derjenigen Versuchstiere mit hochgradig vermindertem IgG noch exakt bestimmbar sind. Sind diese Bedingungen erfüllt, so lassen sich gültige Schlüsse über das Verhalten von nativem IgG ziehen. Die von uns verwendeten Methoden, ihre Vorteile und möglichen Fehlerquellen bezüglich der oben gemachten Voraussetzungen sollen zuerst diskutiert werden.

Verschiedene Techniken sind bisher für die Isolierung von Hühner IgG beschrieben. Zur Gewinnung einer vorwiegend gammaglobulinhaltigen Rohfraktion aus Vollserum geben Leslie und Clem (1969) die Ausfällung der Immunglobuline mittels Na_2SO_4 an. Die weitere Auftrennung erfolgt durch Gelfiltration mit Recycling, d.h. einer nochmaligen Abtrennung der IgG-Fraktion (Porath und Bennich 1962; Gold und Benedict 1967). Daneben findet zur Isolierung von aviärem IgG aus Vollserum die Ionenaustauschchromatographie Anwendung (Benedict 1967; Leslie und Clem 1969). Als weitere Möglichkeit, die hauptsächlich zur Gewinnung haptenspezifischer Anti-

körper eingesetzt wird, sei die Affinitätschromatographie erwähnt (Cuatrecasas 1971; Gold u.a. 1966). Da wir weder bezüglich der Ladung noch nach Antikörperspezifität fraktioniertes IgG gewinnen wollten, schlossen wir die letzten beiden Methoden für die Ausgangspräparation aus.

Von uns wurde das durch fraktionierte Salzfällung gewonnene Protein am Molekularsieb getrennt. Als Trennmedium wurde statt des weitverbreiteten Sephadex G-200 das neuentwickelte Ultrogel AcA-34 eingesetzt, dessen Vorteile aus Abb. 9 ersichtlich sind. Während Sephadex G-200 nur zwei Komponenten einer IgM-reichen Rohfraktion (siehe Material und Methoden 2.1.3.) abzutrennen vermag, unterscheidet Ultrogel AcA-34 drei Molekülgrößen. Die jeweiligen immunoelektrophoretischen Analysen des IgG-Peaks aus beiden Trennungen (Abb. 9 links) unterstreichen den Vorteil von Ultrogel AcA-34, mit dem eine deutlich geringere Verunreinigung gegenüber der Sephadex G-200 Trennung erreicht werden konnte. Die DEAE-Trennung des immunologisch rein erscheinenden IgG (Peak III', Abb. 3b) wurde zur zusätzlichen Überprüfung der Einheitlichkeit der Präparation durchgeführt. Die sich hier ergebende hochgradige Heterogenität (Abb. 3 c) ließ das Vorhandensein von Aggregaten möglich erscheinen. Die Befürchtung wurde durch die Sedimentationsanalyse des Eluates aus Peak III' (Abb. 3 b) ausgeschlossen (siehe Abb. 4 und 8 unten). Die drei DEAE-Peaks (Abb. 3c) stellen jeweils reines IgG unterschiedlicher Oberflächenladung dar. Die daraus resultierende unterschiedliche Migration bei der immunoelektrophoretischen Auftrennung geht aus Abb. 5 Nr. 5 eindeutig hervor. (Die jeweilige Position des Scheitelpunktes der Präzipitationsbögen ist zu beachten). Für die Markierung wurde der erste Peak nach der DEAE-Trennung verwendet, dessen Ladungsverhältnisse der des Gesamt-IgG am ehesten entspricht.

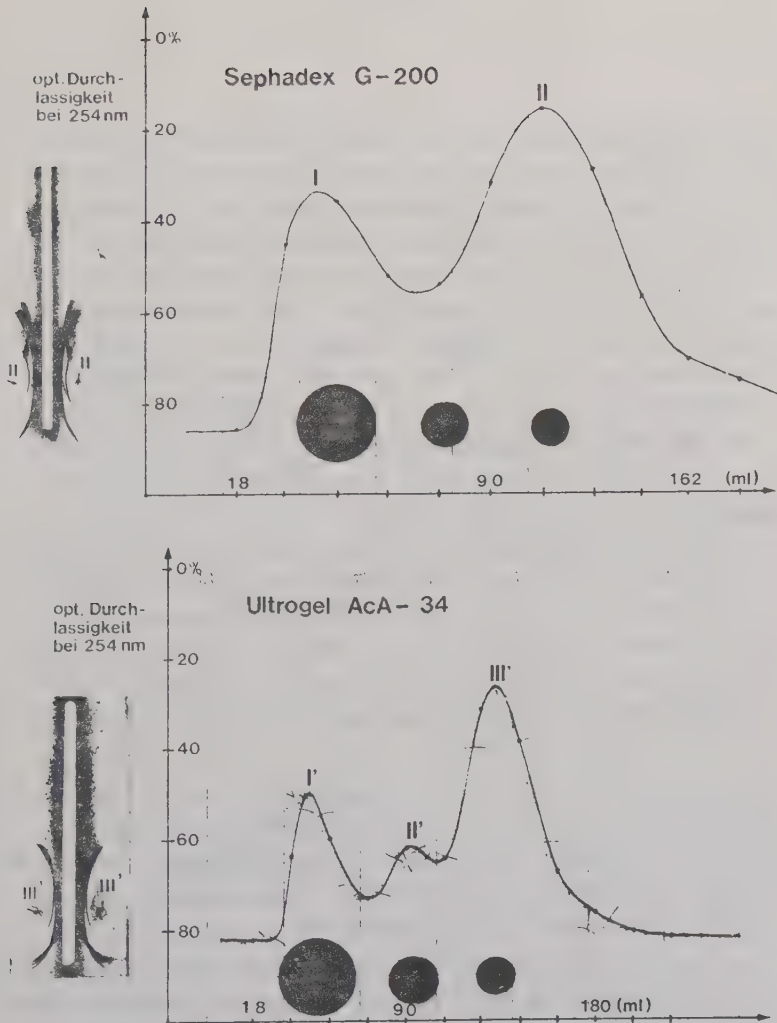


Abb. 9: Vergleich der Trenneigenschaften von Sephadex G-200 und Ultrogel AcA-34 an Hand der Trennung einer Na_2SO_4 -gefällten Globulinfraktion (siehe S.6) mit immunoelektrophoretischer Reinheitsüberprüfung der beiden Eluate (Sephadex-G-200 = Peak II; Ultrogel AcA-34 = Peak III')

Die Punkte entsprechen den vorherrschenden Molekülgrößen in den entsprechenden Trennbereichen (17 S; 9 S; 7 S)

Eine Schädigung im Verlauf der ^{125}J -Markierung ist auszuschließen. Sonoda und Schlamowitz (1970) geben als Grenze für eine Proteinschädigung und deren Auswirkung auf die biologische Halbwertszeit die Einführung von 0,5 - 1 Atomen Jod pro Molekül IgG an. Nach Lang u.a. (1954) werden die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften von IgG durch wenige Atome Jod pro Molekül IgG nicht nachweislich verändert. Wie Pressmann (1950) zeigen konnte, ist selbst durch Kopplung von 18 Atomen Jod pro Molekül IgG die spezifische Präzipitation nicht eingeschränkt. Die Einführung von 0,01 Atomen Jod pro Molekül IgG oder weniger bewirkt, daß die Anzahl von Molekülen, die mit mehreren Jodatomen markiert sind, zurückgeht und somit die markierte Substanz als homogen angesehen werden kann (Sonoda und Schlamowitz 1970). Die von uns errechnete Markierungsdichte lag bei 0,006 Atomen Jod pro Molekül IgG. 99% der Aktivität erwiesen sich als proteingebunden.

Wie aus der Darstellung des Versuchsablaufs (siehe Material und Methoden 2.5.2.) hervorgeht, waren weder eine Beeinflussung der Serum-IgG-Konzentration durch die Zufuhr radioaktiv markierten IgG's noch ein enterales Proteinverlustsyndrom festzustellen.

Unseren Berechnungen liegen die Plasmaeliminationskurven des markierten IgG für das Einzeltier zugrunde. Wie Gabuzda (1962) gehen auch wir von der Vorstellung aus, als ob der Proteinabbau nur im intravaskulären Kompartiment vonstatten ginge, daß sich neu synthetisiertes Protein sofort im Intravasalraum verteilt und anteilmäßig zwischen intravasalen und extravasalen Kompartimenten ausgetauscht wird. Extravasales IgG steht in raschem Aus-

tausch mit dem zentralen Plasmapool und wird somit ebenfalls intravasal abgebaut (Matthews 1957). Das im Verlauf des Proteinabbaus freigesetzte Jod wird sofort ausgeschieden (Gabuzda 1962; Olesen 1963), einer möglichen Wiederaufnahme begegnet man durch die Absättigung der Jod-affinen Organe mit Lugol-scher Lösung. Geht man von der vereinfachten, nicht streng physiologischen Annahme aus, daß es sich beim Extravasalraum um ein einziges Kompartiment handelt, so können wichtige Stoffwechselgrößen von IgG genau bestimmt werden.

Den Anlaß für die vorliegenden Untersuchungen stellen die hochgradig differierenden Serum-IgG-Konzentrationen beider Versuchsgruppen dar (siehe Tab. 3); es wurden solche Tiere ausgesucht, deren IgG-Serumkonzentration $> 5,0$ mg/100 ml Serum betrug, da niedrigere Konzentrationen mit Hilfe der angewandten Meßmethode nicht mehr exakt zu bestimmen sind.

Die Konzentration des Serum-IgG wird einmal durch die Syntheseleistungen in den antikörperbildenden Geweben bestimmt, zum anderen wird sie durch katabole Vorgänge beeinflusst (Fahey und Robinson 1963). Ein Kontrollmechanismus, der auf Veränderungen des IgG-Spiegels anspricht, ist bislang nicht bekannt. Es ist nicht sicher, ob die IgG-Konzentration im Serum oder in anderen Kompartimenten, beziehungsweise der gesamte IgG-Pool die Abbauvorgänge beeinflusst (Fahey und Robinson 1963). Während für den Umsatz von IgG eine Abhängigkeit von der Serumkonzentration als gesichert gilt, scheint dies bezüglich anderer Serumproteine inklusive IgM nicht der Fall zu sein (Waldmann und Schwab 1965; Frommel 1970). Für das Meerschweinchen wurden als ein-

zifer Tierart hiervon abweichende Befunde erhoben. Wie Sell (1965) zeigen konnte, ergaben sich bei Meer-schweinchen mit niedrigem IgG-Spiegel und Kontrollen keine Unterschiede im Abbau von IgG. Die anatomische und zelluläre Seite des Abbaus ist bislang nicht ex-akt erforscht (Fahey und Robinson 1963). Nach Cohen u.a. (1962) werden ca. 30% des IgG in der Leber ver-stoffwechselt. Untersuchungen am Hund (Andersen 1963) zeigen, daß etwa 40% in den Gastrointestinaltrakt se-zerniert werden, wo IgG abgebaut und die Bruchstücke rückresorbiert werden. Freie leichte Ketten (Bence Jones Proteine) werden mit dem Urin ausgeschieden; der größte Anteil dieses Proteins wird in der Niere verstoffwechselt (Wochner 1967), nicht aber das in-takte Proteinmolekül.

Unsere Ergebnisse stellen weder einen Beitrag zur Lokalisierung der Synthese- und Abbauvorgänge des Hühn-ner-IgG dar, noch können auf Grund unserer Ergebnisse Erkenntnisse zur Klärung der Regulatinsmechanismen ge-wonnen werden. Eindeutige Aussagen können aber bezüglich der Poolgröße, des Turnovers sowie der biologischen Halb-wertszeit gemacht werden.

4.2. Kritische Besprechung der Ergebnisse:

Wie eingangs berichtet, liegen in der Literatur keine nachprüfbaren Daten bezüglich des Turnovers von Hühner-IgG vor. Leslie und Clem (1970) errechneten an Hand der Serum IgG ⁺)-Konzentration und biologischen Halbwerts-zeit eine Syntheserate von 58 mg/kg/Tag. Inwieweit in diese Berechnungen die spezifische Aktivität als unab-

+) Bei Leslie und Clem als γ -Y bezeichnet

dingbare Voraussetzung für die Berechnung des IgG-Umsatzes eingeht, ist der oben zitierten Arbeit nicht zu entnehmen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde von uns die biologische Halbwertszeit mit $3,3 \pm 0,7$ Tagen und der Turnover von IgG für die Kontrolltiere mit 115 ± 31 mg/kg/Tag bestimmt. Somit liegen erstmals nachprüfbare Daten über den IgG-Umsatz des Haushuhnes vor.

Zum Vergleich sei an dieser Stelle auf die Turnoverraten zweier Labortierspezies hingewiesen. Fahey und Robinson (1963) geben für die Maus eine Syntheserate von 85 mg γ -Globulin pro kg Körpergewicht und Tag an. Das dem Huhn gewichtsmäßig vergleichbare Kaninchen produziert täglich 80 mg/kg (Fahey und Robinson 1963). Die Abbaurate wird von Andersen und Bjørneboe (1964) für diese Tierart mit 133 mg/kg/Tag angegeben.

Vergleicht man die in der Literatur angegebenen Daten bezüglich der biologischen Halbwertszeit mit unseren Ergebnissen, so ist zu berücksichtigen, daß den Befunden unterschiedliche präparative Maßnahmen, Markierungsmethoden und Meßmethoden zugrundeliegen. Eine Deutung der abweichenden Werte ist deshalb nur bedingt möglich. Für Normaltiere ergibt sich in Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Hühner folgendes Bild:

Patterson (1962) und Iványi (1964) geben mit 1,45 beziehungsweise 1,55 Tagen die niedrigste Halbwertszeit von IgG für erwachsene Hühner an. Der von uns gefundene Wert für adulte Hühner ($2,8 \text{ Tage}^{+}$) liegt zwischen den beiden oben zitierten Angaben und den Untersuchungsergebnissen von Leslie und Clem (1970), die eine biologische Halbwertszeit von 4,1 Tagen ermittelten.

⁺) d.h. ≥ 28 Wochen, siehe Tab. 4

An dieser Stelle sei auf die unterschiedlichen Proteinpräparationsmethoden verwiesen. Während die erstgenannten Autoren (Patterson u.a. 1962 und Iványi u.a. 1964) ammoniumsulfatgefälltes Roh- Gammaglobulin für ihre Untersuchungen einsetzten, gehen Leslie und Clem (1970) ebenso wie wir von rein dargestelltem IgG aus.

Die für normale 6-14 Wochen alte Junghühner ermittelten Ergebnisse bezüglich der biologischen Halbwertszeit (siehe Tab. 5) differieren wegen der eingangs erwähnten methodischen Unterschiede. Als einzige Autoren geben Frommel u.a. (1970) die Halbwertszeit für rein dargestelltes IgG an. Als Kontrollen wurden neonatal subletal bestrahlte Tiere (725 R) benutzt, die für einen Vergleich wenig geeignet erscheinen. Wostmann und Olson (1964) fanden bei Traceruntersuchungen mit 1-C-^{14} Glycin gegenüber Frommel einen um ca. 2 Tage erhöhten Wert. Ebenfalls ohne vergleichbare Daten sind die von Patterson u.a. (1962) an 1-7 Tage alten Küken bestimmten Halbwertszeiten (3,0 Tage).

Phillips (1966) untersuchte das biologische Verhalten von Truthahn Gammaglobulin (TGG) durch Verabreichung von $^{131}\text{-J}$ markiertem TGG an TGG-tolerante Hühner und bestimmte so die biologische Halbwertszeit mit 2,4 Tagen.

Bezieht man die Ergebnisse auf das Alter der jeweils methodisch gleichartig untersuchten Tiere, so scheinen mit höherem Alter leicht reduzierte Halbwertszeiten vorzuliegen. Der deutlichste diesbezügliche Unterschied findet sich bei den Ergebnissen von Patterson u.a. (1962). In dieser Arbeit wurde die extremste Altersdifferenz untersucht, wobei es sich bei den adulten Tieren um legende Hennen handelte.

Patterson u.a. (1962) gehen von der Annahme aus, daß der von ihnen bestimmte Gammaglobulinverlust aus der Zirkulation in die sich entwickelnden Eifollikel legender Hennen zu einer Verkürzung der γ -Globulin Halbwertszeit bei der Legehenne führt. Iványi u.a. (1964) diskutieren dieses Phänomen und begründen damit die längere Halbwertszeit der dysgammaglobulinämischen Hähne. Die relativ lange Halbwertszeit des Gamma-Globulins 1-7 Tage alter Küken rührt nach Ansicht von Iványi u.a. (1964) von der physiologischen Hypogammaglobulinämie frisch geschlüpfter Küken her. Wir können keinen dieser Punkte bestätigen. Die legenden Hennen (Nr. 6683, Nr. 6695, Nr. 2295, Nr. 3309) wiesen kein differentes Verhalten bezüglich der IgG Halbwertszeit und des Turnovers von IgG auf. Auch die Halbwertszeit der Hähne (Nr. 823 und Nr. 0) unterscheidet sich nicht grundlegend von der der Hennen beziehungsweise Junghennen.

Bezüglich der "physiologischen Hypogammaglobulinämie" der Küken ist hervorzuheben, daß Eintagsküken 30-80% der IgG-Norm adulter Hühner aufweisen, daß die Konzentration dieses Immunproteins nach dem Schlupf auf einen Mittelwert von ca. 60% der Norm ansteigt und erst vom ca. 4. Lebenstag an abfällt. Der Tiefpunkt wird um den 15-ten Lebenstag mit 22% der Norm erreicht (Lösch 1972). 1-7 Tage alte Küken weisen demnach keine deutliche Hypogammaglobulinämie auf. Allenfalls bei 2-3 Wochen alten Küken kann von einer deutlich verminderten IgG-Konzentration im Serum gesprochen werden. Die Auswirkung einer deutlichen Verminderung der Serumkonzentration auf die IgG Halbwertszeit wird im folgenden Abschnitt der Diskussion besprochen.

Hochgradig erniedrigte IgG-Serumkonzentrationen können sowohl erblich bedingt sein, wie bei der hier vorliegenden Dysgammaglobulinämie, oder in Abhängigkeit von einer reduzierten Umweltantigenität (Keimfreihaltung) auftreten (Merkenschlager, 1967). Beim Vogel können außerdem Hypogammaglobulinämien experimentell induziert werden; hierbei bedient man sich der chirurgischen, chemischen oder kombinierten Eliminierung der Bursa Fabricii (zusammenfassend Lösch 1972).

Da sowohl von keimfreien (Wostmann und Olson 1964), als auch von bursektomierten Tieren (Frommel 1970) Daten über die IgG-Halbwertszeit vorliegen, sollen diese Ergebnisse ebenso wie die der Normaltiere in Abhängigkeit vom Alter, der Immunglobulinpräparation und Bestimmungsmethode betrachtet werden.

Werte bezüglich der biologischen Halbwertszeit von erwachsenen hypogammaglobulinämischen Hühnern liegen nur von unserer Seite vor. Bei Junghühnern (6-14 Wochen) liegen ausschließlich solche Befunde vor, die mit Hilfe einer gereinigten IgG-Präparation erhoben wurden (Frommel 1970), beziehungsweise Befunde aus Traceruntersuchungen (Wostmann und Olson 1964).

Während bei den adulten normalen Tieren unterschiedliche Halbwertszeiten beobachtet wurden, differieren die Ergebnisse bei den hypogammaglobulinämischen Junghühnern weit weniger. Frommel u.a. (1970) geben für bursektomierte und ganzkörperbestrahlte Tiere eine biologische Halbwertszeit von 3,45 beziehungsweise 3,75 Tage an. Für keimfrei gehaltene Tiere fanden Wostmann und Olson (1964) 4,2 Tage. Die von uns ermittelten Daten in dieser Altersgruppe liegen bei 4,9 Tagen (4,9; 5,5; 4,3).

Frommel u.a. (1970) ziehen aus ihren an bursektomierten Küken erhobenen Experimentaldaten den Schluß, daß das verminderte Serum-IgG dieser Tiere eine deutlich verlängerte Halbwertszeit habe. Die Autoren sehen hierin eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die an hypogammaglobulinämischen Menschen erhoben wurden. Die Kontrollgruppe im zitierten Experiment bestand allerdings aus neonatal subletal bestrahlten Küken. Unter

SPECIES	HWZ ° (Tage)	min. max. (Tage)	ALTER	PRÄP.	ISO- TOP	QUELLE	
MENSCH NORMO.	23.0	21.0 26.0	adult	γ-Glob.	131 J	COHEN u. FREEMAN	1960
"	21.5	18.9 24.1	"	IgG	131 J	WALDMANN u. SCHWAB	1965
"	12.3	8.9 15.7	"	"	131 J	SPIEGELBERG u.a.	1968
MENSCH HYPO.	12.0	—	"	γ-Glob.	1) 131 J	SELZER u.a.	1955
"	32.5	30.0 35.0	6 J	"	1) 131 J	ZAK u.a.	1959
"	32.6	21.7 44.9	13-54 J	"	131 J	MARTIN u.a.	1957
"	38.0	28.0 71.0	16-50 J	IgG	131 J	WALDMANN u. SCHWAB	1965
"	11/24	—	50 J	γ-Glob.	131 J	OWEN u.a.	1956
HUHN NORMO.	3.0	—	1-7 Tg.	50 %	131 J	PATTERSON u.a.	1962
"	2.1 3)	—	6 Wo	IgG 4)	125 J	FROMMEL u.a.	1970
"	2.4	1.9 2.9	8 "	"	131 J	PHILLIPS	1966
"	3.6	2.7 4.3	12 "	IgG	125 J	DIESE ARBEIT	1977
"	4.3	4.1 4.4	13 "	—	14 C ⁵¹	WOSTMANN u. OLSON	1964
"	2.0	—	14 "	40 %	131 J	IVÁNYI u.a.	1964
"	4.1	—	≥28 "	IgG 6)	125 J	LESLIE u. CLEM	1970
"	1.4	—	"	50 %	131 J	PATTERSON u.a.	1962
"	2.8	2.7 3.0	"	IgG	125 J	DIESE ARBEIT	1977
"	1.5	—	"	40 %	131 J	IVÁNYI u.a.	1964
HUHN HYPO.	3.7 7)	—	6 "	IgG	125 J	FROMMEL u.a.	1970
"	3.4 8)	—	6 "	"	14 C ⁵¹	"	"
"	4.2 9)	4.1 4.3	13 "	—	125 J	WOSTMANN u. OLSON	1964
"	4.9 10)	4.3 5.5	14 "	IgG	"	DIESE ARBEIT	1977
"	3.5 10)	3.4 3.7	≥28 "	"	"	"	"

Tab. 5: Die biologische Halbwertszeit (HWZ) von Gammaglobulin beziehungsweise gereinigtem IgG beim Menschen und Huhn unter Berücksichtigung des Alters, des Immunglobulinstatus, der Immunglobulinpräparation (Präp.) und der Meßmethode. (HYPO = Hypogammaglobulinämie; NORMO = normale Vertreter der untersuchten Spezies)

Erläuterungen siehe S. 42 unten

Berufung auf Bazin und Mallet (1969) schließen Frommel u.a. (1970) eine Beeinflussung des IgG-Stoffwechsels durch die Bestrahlung aus. Es erscheint aber wahrscheinlicher, daß die Halbwertszeit der 'IgG-armen' bursektomierten Küken der Norm entspricht und die Halbwertszeit der Kontrollgruppe mit 2,1 Tagen leicht unter der Norm liegt (siehe auch Diskussion der Daten von Patterson u.a. 1964, Seite 39).

Aus der vergleichenden Betrachtung der Gesamtergebnisse kann keine grundsätzliche Verlängerung der Halbwertszeit von Hühner IgG bei niedrigem IgG-Spiegel ersehen werden. Ammoniumsulfat-gefälltes Gammaglobulin scheint gegenüber rein dargestelltem IgG eine verkürzte Halbwertszeit aufzuweisen. Unsere Experimentaldaten stehen in guter Übereinstimmung mit den zitierten methodisch gleichartig erhobenen Befunden.

Während bei der Maus eine geringgradige Verlängerung der Halbwertszeit in Abhängigkeit vom verminderten Gammaglobulinspiegel (Keimfreihaltung) festgestellt wurde (Sell und Fahey 1964; Sell 1964), werden bei hypogammaglobulinämischen Menschen sowohl verlängerte als auch nicht beeinflusste Halbwertszeiten mitgeteilt (siehe Tab. 4). Bezüglich der Humanergebnisse ist besonders zu berücksichtigen, daß die Halbwertszeit von IgG stark differierend angegeben wird. Demzufolge scheint zumindest keinesfalls eine zwingende Notwendigkeit zwischen erniedrigtem IgG-Spiegel und verlängerter Halbwertszeit bestehen zu müssen.

Erläuterungen zu Tab. 4:

- 1) Abbaurate passiv zugeführten γ -Globulins
- 2) Ammoniumsulfat gefälltes Präzipitat
- 3) neonatal subletal bestrahlt
- 4) Ammoniumsulfat gefälltes Truthahn γ -Globulin
- 5) Traceruntersuchungen mit ^3H -C-14 Glycin
- 6) IgY
- 7) neonatal subletal bestrahlt und bursektomiert
- 8) neonatal bursektomiert
- 9) Keimfreihaltung
- 10) Dysgammaglobulinämie

Vielmehr scheint eine eindeutige Altersabhängigkeit vorzuliegen. Dixon u.a. (1952) ermittelten für 6 Monate bis 8 Jahre alte Kinder eine biologische Halbwertszeit von 20,3 Tagen und von 13 Tagen für Erwachsene. Selzer u.a. (1955), die ähnliche Ergebnisse erzielten (20 Tage für Kinder und 12 Tage für Erwachsene) schließen daraus, daß bei Patienten mit idiopathischer Hypogammaglobulinämie die Abbaurate (Halbwertszeit) von injiziertem Gammaglobulin der Norm entspricht. Die an dysgammaglobulinämischen Hühnern von uns erhobenen Befunde decken sich mit diesen Ergebnissen. Die Halbwertszeit ($\emptyset = 4,3$ Tage; 3,4 bis 5,5) liegt zwar etwas höher als bei der Kontrollgruppe ($\emptyset = 3,3$ Tage = 2,7 bis 4,3); eine signifikante Differenz konnte aber nicht nachgewiesen werden.

(Altersunterschiede bleiben auf Grund der geringen Tierzahlen hierbei unberücksichtigt, um einen Mittelwertsvergleich vornehmen zu können).

Aber auch bei den von uns untersuchten Hühnern liegt bei den Erwachsenen die relativ kürzere Halbwertszeit gegenüber den Jungtieren vor (siehe Tab. 4). Bezogen auf den gesamten IgG-Pool werden von dysgammaglobulinämischen und Kontrollhühnern in etwa der gleiche Prozentsatz von IgG pro Tag umgesetzt (12% beziehungsweise 15%). Demgegenüber liegt der Turnover pro Zeiteinheit bei den dysgammaglobulinämischen Tieren mit 3,07 mg IgG/kg/Tag wesentlich unter dem der Kontrollen (115,67 mg IgG/kg/Tag). Die von anderen Autoren belegte Abhängigkeit des IgG-Umsatzes von der Serumkonzentration dieses Immunglobulins (Waldmann und Schwab 1956) scheint sich demnach auch für die erblich dysgammaglobulinämischen Hühner zu bestätigen.

Untersuchungsergebnisse hinsichtlich des IgG-Turnovers an anderen hypogammaglobulinämischen und normalen Hühnern liegen bislang nicht vor. Eine vergleichende Betrachtung der von uns ermittelten Werte ist daher leider nicht möglich.

Abschließend kann gesagt werden, daß die hochgradig erniedrigte IgG-Serumkonzentration der erblich dysgammaglobulinämischen Hühner auf einem IgG-Synthesedefekt beruht, wobei der prozentuale Anteil am umgesetzten Gesamt-IgG nicht different ist, wohl aber die IgG-Umsatzraten (3 zu 116 mg/kg/Tag). Erwartungsgemäß konnte auch keine Differenz bezüglich der biologischen Halbwertszeit zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden, da eine Verlängerung der Halbwertszeit nur bei einer prozentual verringerten Umsatzrate zu erwarten gewesen wäre. Somit wird noch einmal begründet, daß zur Klärung von Stoffwechselvorgängen der beschriebenen Art nicht die Bestimmung der Halbwertszeit, sondern des Turnovers in Abhängigkeit von der Zeit und der spezifischen Aktivität gültige Aussagen über den Stoffwechsel von IgG erbringt.

5.

Zusammenfassung:

=====

Mit Hilfe fraktionierter Natriumsulfatfällung, Ultrageltrennung und Ionenaustauschchromatographie wurde ein hochgereinigtes Immunglobulin-G (IgG, $S_{20}^w = 6,9$) vom Haushuhn gewonnen. Durch Markierung mit ^{125}J (spezifische Aktivität = $53 \mu\text{Ci/mg IgG}$) wurden Gesamtpool, Turnoverrate und biologische Halbwertszeit von IgG bestimmt.

Hierzu wurde eine Gruppe erblich dysgammaglobulinämischer Hühner ($11,6 \pm 6,4 \text{ mg IgG/100 ml Serum}$) mit einer entsprechenden Kontrollgruppe ($652 \pm 102 \text{ mg IgG/100 ml Serum}$) verglichen.

Ausgehend von völlig verschiedenen Poolgrößen ($24,8 \pm 16,1 \text{ mg/Tier}$ gegenüber $783,7 \pm 156,5 \text{ mg/Tier}$ bei den Kontrollen) ergaben sich Turnoverraten von durchschnittlich $0,18 \text{ mg/Stunde}$ ($\pm 0,14$) bei den dysgammaglobulinämischen und $7,064 \text{ mg/Stunde}$ ($\pm 1,85$) bei den Kontrollhühnern. Bezüglich der biologischen Halbwertszeit konnte für die beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($4,3 \text{ Tage} \pm 0,85$ beziehungsweise $3,3 \text{ Tage} \pm 0,71$ bei den Kontrollen).

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß der IgG-Mangel bei den Vertretern der dysgammaglobulinämischen Zuchtlinie nicht die Folge eines beschleunigten Abbaus, sondern auf eine hochgradig verminderte Syntheserate zurückzuführen ist. Methoden, Auswertung und Ergebnisse werden an Hand der wenigen in der Literatur vorliegenden vergleichbaren Angaben diskutiert.

6. Summary:
=====

Highly purified chicken IgG ($S_{20}^w = 6.9$) was obtained through fractionated Na_2SO_4 -precipitation, gel filtration and ion exchange chromatography. ^{125}I -labelled IgG (specific activity = $53 \mu\text{Ci/mg}$ IgG) was used to compare pool size, turnover-rate and biological half-life of IgG between dysgammaglobulinemic hens (serum concentration = 11.6 ± 6.4 mg IgG/100 ml) and control animals (serum concentration = 652 ± 102 mg IgG/100 ml). Average turnover-rates of 0.18 mg/hr (± 0.14) and 7.064 mg/hr (± 1.85) were associated with the very different pool sizes (24.8 ± 16.1 mg/animal; 783.7 ± 156.5 mg/animal) of the dysgammaglobulinemic hens and control animals, respectively. No significant difference in biological half-life was observed (dysgammaglobulinemic chicks = 4.3 ± 0.85 d; control animals = 3.3 ± 0.71 d). These results indicate that IgG deficiency in this breed of dysgammaglobulinemic chicken does not result from an accelerated catabolism but rather from a greatly decreased synthetic rate. Methods, calculations and results were compared with the few previous similar reports in the literature.

Literaturverzeichnis:
=====

- Andersen, S.B., Glennert, J., Wallewick, K.: Intestinal degradation of gammaglobulin in the dog
Nature 199, 1096 (1963)
- Andersen, S.B., Bjørneboe, M.: Gamma globulin turnover in rabbits before and during hyperimmunization
J. exp. Med. 119, 537 (1964)
- Bazin, H., Malet, F.: The metabolism of different immunoglobulin classes in irradiated mice
Immunol. 17, 345 (1969)
- Benedict, A.A.: Production and purification of chicken immunoglobulins
Aus: 'Methods in immunology and immunochemistry'
ed. by C.A. Williams und M.W. Chase Vol. I
Academic Press New-York, London 130, 229 (1967)
- Brüggemann, J., Merckenschlager, M., Kirchner, B., Lösch, U.: Eine erbliche Hypo- bzw. Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn
Naturwissenschaften 54, 97 (1967)
- Brüggemann, J., Friedrich, U., Lösch, U.: Vergleichende Bestimmungen der Immunglobulinspiegel genuin dysgammaglobulinämischer und "hormonell bursktomierter" Hühner
Z. Tierphysiol., Tierernährung und Futtermittelkunde 24, 317 (1969)

- Erüggemann, J., Lösch, U., Schmidt, D.O.: Zur Antikörper-
produktion dysgammaglobulinämischer Hühner
I Isohämagglutinine
Z. Immunitätsforsch. 141, 280 (1971)
- Burstein, M., Samaille, J.: Nouvelle methode de séparation
et de dosage des lipoproteins de faible densité
Annales de biologie clinique 17, 23 (1959)
- Cohen, S., Freeman, T.: Metabolic heterogeneity of human
 γ -globulin
Biochem. J. 76, 475 (1960)
- Cohen, S., Gordon, A.H., Matthews, C.: Catabolism of
 γ -globulin by the isolated perfused rat liver
Biochem. J. 82, 197 (1962)
- Cuatrecasas, P., Anfinsen, C.B.: Affinity chromatography,
In: 'Methods in Enzymology'; eds. Colowick, S.P.,
and Kaplan, N.D.;
Academic Press New-York 345 (1971)
- Dixon, F., Talamage, D.W., Maurer, P.H., Deichmiller, M.:
The half-life of homologous gamma globulin
(antibody) in several species
J. exp. Med. 96, 313 (1952)
- Fahey, J.L., Robinson, G.: Factors controlling γ -globulin
concentration
J. exp. Med. 118, 845 (1963)

- Flodin, P., Killander, J.: Fractionation of human serum proteins by gel filtration
Biochim. Biophys. Acta 63, 403 (1962)
- Francis, G.E., Fulligan, W., Wormall, A.: Labelling of proteins with iodine-¹³¹, sulfur-³⁵ and phosphorus-³²
Nature, London 167, 748 (1951)
- Frommel, D., Perey, D.Y.E., Good, R.A.: Metabolism of γ -G and γ -M immunoglobulins in normal and hypogammaglobulinemic chickens
J. Immunol. 105, 1 (1970)
- Gabuzda, T.G.: The turnover and distribution of ¹³¹I-labeled myeloma and macroglobulin proteins
J. Lab. Clin. Med. 59, 65 (1962)
- Gold, E.F., Cordes, S., Lopez, M.A., Knight, K.L.: Studies on chicken γ -globulin and hapten-specific chicken antibodies
Immunochemistry 3, 433 (1966)
- Gold, E.F., Benedict, A.A.: Comparison of polypeptide chains of gamma-globulin from bursectomized and normal chickens
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 535 (1967)
- Gruber, F.: Studien zur Bestimmung der Immunglobulin-spiegel am Beispiel normaler, gnotobiotischer und konventionalisierter Küken
Inauguraldissertation Uni. München (1968)

- Hoffmann-Fezer, G., Lösch, U., Hoffmann, R., Schmahl, W.:
Verminderung oberflächengebundener Lympho-
zyten genuin dysgammaglobulinämischer Küken
Z. Immun. Forschg. 147, 61 (1974)
- Jványi, J., Hraba, T.: A contribution to the study of
immunological tolerance to protein antigens
in the chicken
Fol. Biol. (Prag) 9, 354 (1963)
- Jványi, J., Hraba, T., Černý, J.: The elimination of
heterologous and homologous serum proteins
in chickens at various ages
Folia Biol. 10, 275 (1964)
- Kekwick, R.A.: The serum proteins in multiple myeloma-
tosis
Biochem. J. 34, 1248 (1940)
- Lang, N., Schettler, G., Wildhack, R.: Über einen Fall
von "Agammaglobulinämie" und das Verhalten
parenteral zugeführten radioaktiv markierten
Gammaglobulins im Serum
Klin. Wochenschrift 32, 856 (1954)
- Leslie, G.A., Clem, L.W.: Phylogeny of immunoglobulin
structure and function: III Immunoglobulins
of the chicken
J. exp. Med. 130, 1337 (1969)
- Leslie, G.A., Clem, L.W.: Chicken immunoglobulins:
biological half-lives and normal adult serum
concentrations of IgM and IgY
Proc. Soc. Exp. Med. 134, 195 (1970)

- Lösch, U.: Zur Charakterisierung einer erblichen
Dysgammaglobulinämie
Habilitationsschrift Uni. München (10)
- Lösch, U., Hartmann, W., Riedel, G.: Zur Antikörper-
produktion dysgammaglobulinämischer Hühner
II Präzipitine
Z. Immunitätsforsch. 143, 16 (1972)
- Lösch, U., Hoffmann-Fezer, G.: Vergleichende histolo-
gische und immunologische Untersuchungen
an immunologisch defekten Hühnern
II Erblisch dysgammaglobulinämische Hühner
Zbl. Vet. Med. A 20, 596 (1973)
- Märki, H.H.: In: Klinische Pathophysiologie;
herausgegeben von W. Siegenthaler
Thieme Verlag Stuttgart (1970)
- Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F.:
Immunochemical quantitation of antigens by
single radial immunodiffusion
Immunochemistry 2, 235 (1965)
- Martin, L.N., Leslie, G.A.: IgM-forming cells as the
immediate precursor of IgA producing cells
during ontogeny of the immunoglobulin
producing system of the chicken
J. Immunol. 113, 1, 120 (1974)
- Matthews, C.M.E.: The theory of tracer experiments with
¹³¹I-labelled plasma proteins
Physics Med. and Biol. 2, 36 (1957)

- McConahey, P.J., Dixon, F.J.: A method of trace iodination of proteins for immunological studies
Int. Arch. Allergy 29, 185 (1966)
- Merkenschlager, M., Lösch, U., Kirchner, B., Riedel, G., Gruber, F.: Immunglobulingehalte im Serum junger gnotobiotischer Mastküken
Z. Tierphysiol. Tierern. u. Futtermittelkde. 22, 337 (1967)
- Oberdorfer, A., Lösch, U.: Das sedimentationsanalytische Serumeiweißbild dysgammaglobulinämischer Hühner (*Gallus domesticus*)
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 1007 (1970)
- Olesen, H.: Turnover studies with iodine-labeled gamma-macroglobulin and albumin
Scand. J. Clin. and Lab. Investigation 15, 497 (1963)
- Ouchterlony, Ö.: Diffusion-in-gel-methods for immunological analysis
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 25, 186 (1948)
- Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O., Dixon, F.J.: The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen
J. Gen. Physiol 45, 501 (1962)

- Phillips, J.M.: Tolerance of turkey γ -globulin in chickens
Immunology 11, 163 (1966)
- Porath, J. Bennich, H.: Recycling chromatography
Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 152 (1962)
- Pressmann, D., Sternberger, L.A.: The relative rates of iodination of serum components, and the effect of iodination on antibody activity
J. Amer. Chem. Soc. 72, 2226 (1950)
- Rosen, F.S., Kery, S.V., Merter, E., Janeway, Ch.A., Gitlin, D.: Recurrent bacterial infections and dysgammaglobulinemia of 7-S gamma-globulin in the presence of elevated 19-S
Pediatrics 28, 182 (1961)
- Schäfer, B.: Studien zur zellvermittelten Immunität immunologisch defekter Hühner
Inauguraldiss. Uni. München (1972)
- Scheidegger, J.J.: Une micromethode de l'immunoélectrophorèse
Int. Arch. Allergy 7, 235 (1955)
- Sell, S., Fahey, J.L.: Relationship between γ -globulin metabolism and serum gamma globulin in germfree mice
J. Immunol. 93, 81 (1964)
- Sell, S.: γ -globulin metabolism in germfree guinea pigs
J. Immunol. 92, 559 (1964)

- Selzer, G., Paron, S., Toporek, M.: Idiopathic hypogammaglobulinemia and agammaglobulinemia
New England J. Med. 252, 252 (1955)
- Shipley, R.A., Clark, R.E.: Tracer methods for in vivo kinetics, theory and applications
Academic Press New-York - London (1972)
- Sonoda, S., Schlamowitz, M. Studies of ¹²⁵I trace labeling of immunoglobulin-G by chloramin-T
Immunochemistry 7, 885 (1970)
- Spiegelberg, H.L., Fishkin, B.G., Grey, H.M.: Catabolism of human γ G-immunoglobulins of different heavy chain subclasses
J. Clin. Invest. 47, 2323 (1968)
- Waldmann, T.A., Schwab, P.J.: IgG (7 S gamma-globulin) metabolism in hypogammaglobulinemia: Studies in patients with defective gamma-globulin synthesis, gastrointestinal protein loss or both
J. Clin. Invest. 44, 1523 (1965)
- Weigle, W.O., Dixon, F.J.: The antibody response of lymph node cells transferred to tolerant recipients
J. Immunol. 82, 516 (1959)
- Wochner, R.D., Stober, W., Waldmann, T.A.: The role of the kidney in the catabolism of bence jones proteins and immunoglobulin fragments
J. exp. Med. 126, 207 (1967)

Wostmann, B.S., Olson, G.B.: Precipitating antibody
production in germfree chickens
J. Immunol. 92, 41 (1964)

Lebenslauf

Am 01. Mai 1948 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Johann Bohner und seiner Ehefrau Emma geb. Baumann in Ulm geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Nersingen wechselte ich 1960 zum Realgymnasium in Neu-Ulm über. Die Reifeprüfung legte ich 1969 im Land-erziehungsheim Schondorf ab, das ich ab 1966 besuchte.

Nach einem Semester Tiermedizin in Hannover setzte ich dieses Studium in München fort, wo ich im Wintersemester 1975/76 das Staatsexamen ablegte.

Zur Anfertigung meiner vorliegenden Dissertation arbeitete ich von Januar 1976 bis Mai 1977 am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin der Universität München.

Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes
und die günstigen Bedingungen im Institut
danke ich Herrn Professor Dr. H. Zucker.

Herrn Dr. U. Lösch sei für die jederzeit
großzügig gewährte Förderung bei der
Durchführung der Arbeit herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. D. Herlyn
für die hilfreiche Einarbeitung und vorbild-
liche Betreuung.

Dank auch für die nützlichen Diskussionen
mit Mitarbeitern des Hauses.

